



# 電子顕微鏡法と画像の統計的解析を用いた細胞運動に関わる糸状仮足の成長メカニズム解明

著者	荒牧 慎二
発行年	2016-09-23
学位授与番号	17104甲情工第315号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10228/5894">http://hdl.handle.net/10228/5894</a>

氏名	荒牧 慎二		
学位の種類	博士 (情報工学)		
学位記番号	情工博甲第315号		
学位授与の日付	平成28年9月23日		
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	電子顕微鏡法と画像の統計的解析を用いた細胞運動に関わる糸状仮足の成長メカニズム解明		
論文審査委員	主査	教授	安永 卓生
			坂本 順司
			青木 俊介
			伊藤 高廣
		准教授	岩崎 憲治

## 学位論文内容の要旨

ヒトをはじめ、多細胞生物は様々な機能を持つ細胞が集まり、組織を形成し、器官・器官系・個体と階層性により、複雑な機能を実現する。その中でも、「個」としての挙動を統合し、制御するものが神経系である。神経細胞一個の単位としては、複雑な機能を実現することが出来ないが、神経細胞が互いに相互作用し、複雑なネットワークを形成することで、ユニークな「個」を実現している。この複雑なネットワークを形成するために、必要な機能が、細胞の「運動能」である。神経細胞は、神経伝達物質などに影響を受け、能動的な運動をすることができる。多くの生命は、アデノシン三リン酸(ATP)と呼ばれる化学物質を、「エネルギー通貨」として利用し、細胞の「梁」である細胞骨格タンパク質を組み替えることにより細胞の形を変化させ、その変形を通して運動している。この細胞骨格タンパク質の動態を観察することで、細胞の運動メカニズムを理解できる。この運動メカニズムの解明は、神経細胞がネットワークをつくる際の基本機能であり、そのメカニズム解明に繋がる。

本研究では、細胞が持つ運動に関与するもののなかでも、「フィロポディア (糸状仮足; filopodia)」に注目した。フィロポディアは、細胞の先端に存在する細長い構造であり、細胞において触覚の様な役割を持つ。その他にも、傷の修復、がん細胞の浸潤機能、細胞外マトリクスへの細胞接着、胚発生などにも関与している。さらには、がん細胞においては、フィロポディアが、正常な細胞と比較して多く発生することが知られている。このように、フィロポディアは、細胞にとって様々な機能を担っているにもかかわらず、その形成・機能に関する分子メカニズムは未だによくわかっていない。

フィロポディア内には、アクチンフィラメントの束があることが従来わかっている。

また、その束化にとっては、ファシンと呼ばれるタンパク質がその役割を担い、フィロポディアの「硬さ」を作り出していることがわかってきた。しかしながら、アクチンフィラメントの伸長・束化に比べると、ファシンは高速に脱着を繰り返すことが報告されていた。このことが、フィロポディア自身が高速に伸張、収縮を繰り返す「しなやかさ」を生み出すと考えられていたが、その構造学的基盤はまったく明らかになっていなかった。

以上のことから、神経細胞を対象として、神経細胞伸長の際に多数観察されるフィロポディアの形成・機能メカニズムを、細胞・フィロポディア内でのアクチンフィラメントおよび束化因子・ファシンの構造決定から、明らかにすることを目指した。これを通して、神経細胞のネットワーク形成の基本機能に関する分子メカニズムに迫ることができよう。特に、構造生物学の観点から、フィロポディアの機能メカニズムに迫るものとした。

そこで、培養中の神経細胞を液体エタンにより急速凍結し、その構造を固定し、無染色、凍結状態のままの状態を極低温ステージを用いて細胞を観察し、フィロポディアの同一視野傾斜シリーズを多数撮影した。その後、クライオ電子線トモグラフィー法、コンピュータを用い、3次元画像処理技術を用いて、そのフィロポディア内部の構造を明らかにした。その分解能は4ナノメートルを超えるものであった。この構造を基に、フィロポディア内でアクチンフィラメントが、アクチンフィラメント架橋タンパク質（ファシン）により束化されるアーキテクチャ及びそのメカニズムを解明した。

まず、フィロポディア内のアクチンフィラメントは、ファシンにより、規則正しい六方格子状に束ねられていた。加えて、六方格子のひとつの断面内では、アクチンフィラメントのハーフピッチである 36 nm 周期で架橋構造が観察された。フィロポディア内で束化したアクチンフィラメントの本数は、十数本のものから百本以上であることがわかった。特に、ここで、興味深い点は、従来の研究では、フィロポディア内でアクチンフィラメントが束ねられる本数は、再構成系では最大で 20 本程度であったこと、また、理論的な考察から最適な数は、30 本程度と報告されていた点にある。我々の観察の中では、百本以上が束ねられているフィロポディアも観察できた。この時、フィロポディア内のアクチンフィラメントは、30 本程度の小さな束が、3 つ、4 つと集まることで、太い束を形成していた。すなわち、30 本を基礎にそれが複数集まることでさらに強固で太いフィロポディアを形成していることが初めて明らかとなった。

次に、アクチンフィラメントが、フィロポディア中で束ねられる構造に着目した。アクチンフィラメントがファシンにより束ねられるとき、六方格子が持つ3つの対角線方向のうち、二方向にのみ架橋構造を持つことを初めて発見した。加えて、この架橋構造は隣り合うアクチンフィラメントの位相差に起因するジオメトリにより制御されていることが分かった。この時、位相差とは、隣り合うアクチンフィラメントにおける長さ方向のずれを意味している。このフィラメント間の位相差、架橋を持つフィラメン

ト間では、**2.73 nm** であり、架橋のない方向では、**2.73 nm** よりも大きなシフトとして観察された。この **2.73 nm** という値は、アクチンフィラメントにおいて、モノマ間の距離と一致していた。これは規則正しいアクチン束を作成するために注目すべき点である。

加えて、フィロポディア内におけるそれぞれのアクチンフィラメント自身の構造に注目した。アクチンフィラメントの構造特性を示す指標の一つである、そのために、三次元構造内のらせんの特性を個々のらせんから見出すための統計的処理方法を開発し、アクチンフィラメントの三次元構造からそのらせん特性を見出した。その結果、今回の構造にねじれ特性は、ファシンにより束ねられているフィロポディア内では、**-166.6 °/subunit** であることがわかった。抽出されたアクチンでは、アクチンフィラメントのねじれ構造は、複数の状態を持つことが知られているが、フィロポディア内におけるアクチンフィラメントのねじれ構造は、抽出後再構成されたアクチンフィラメントと比較して、そのゆらぎに関して、小さいことを示している。また、そのねじれ構造はアクチンフィラメントに対して、外力がかかっている状態のねじれ構造と非常に近かった。これは、フィロポディア内部においては、アクチンフィラメント束が細胞内で一方向に動いていることと合わせて考えると、その機能として外力（張力）を受ける、もしくは、張力を発生させる必要があることに由来するのではないかと考えた。

最後に、細胞内において、アクチンフィラメントが、ファシンにより束ねられる様式を、アクチンフィラメントの架橋部位のサブトモグラムアベレージング法（相関法による三次元平均化法）により、よりノイズの少なく、高分解能の構造として明らかにした。架橋構造の三次元平均構造に対して、現在までに異なる手法で解かれた、アクチン及びファシンの原子モデルを、相関法を用いてフィッティングした。これにより、アクチンフィラメントが架橋される際の結合様式、結合部位を、初めてアミノ酸レベルで示すことができた。ファシンで予測されていた3つの結合部位はそれぞれ1：2に分かれ、それぞれで異なるアクチンフィラメントと結合していることがわかった。われわれは、それを **SBS (Single Binding Site)** および **DBS (Double Binding Site)** と名付けた。加えて、結合部位が1箇所である **SBS** では、主として、アミノ酸1つでの結合が示唆されている側であった。加えて、アクチンフィラメント束の周辺では **DBS** で結合したと考えられるファシンの列が、**36 nm** という周期性をもって、アクチンフィラメント上に沿って観察された。この時、ファシンが周期性をもって結合する理由は、アクチンフィラメントがもつ協同的な構造変化によるものであろう。これらのことは、ファシンは、それぞれ **DBS** と **SBS** がそれぞれ、強い結合と弱い結合といった2つの異なる性質を示し、かつ、その結合様式の違いを利用することにより、フィロポディアの特性である、「硬さ」と「しなやかさ」の、全く性質の異なる二つを両立しているのではないかと考えた。

そこで、以上の観察結果を踏まえて、新たに、フィロポディアの中でアクチンフィラ

メント束が成長し、フィロポディアを安定化するメカニズムについて提唱した。まず、フィロポディア内では、アクチンフィラメント束の最周辺部のアクチンフィラメントに対して、ファシンの DBS が 36 nm 周期で結合をする次に、ベースとなるアクチンフィラメントに結合したファシンに対して、短いアクチンフィラメントがリクルートされる。そして、残りの方向へファシンが埋まることにより、アクチンフィラメントの束が太くなっていくとして提案した。

また、ここで開発したらせん構造のねじれの統計的解析、及び、平均化のアルゴリズムは、アクチンや微小管などの細胞骨格系タンパク質の細胞内での構造解析にとって有効な技術である。今後、他の細胞や細胞内の構造における細胞骨格の構造解析で利用されうる。

以上の研究を通して、神経細胞のフィロポディア内部のアクチンフィラメント束の形成メカニズム、ひいては、神経細胞の伸張に関わる基本的な機能発現のメカニズムに繋がる知見を得ることができた。今後、更に、相関顕微鏡法や凍結切片法等の新しい技術により、細胞内の構造を高分解能で観察していきたい。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究では、クライオ電子線トモグラフィー法と画像の統計的解析手法を用いて、細胞運動に関わる糸状仮足のアーキテクチャを解析し、内部に存在するアクチン束及び、糸状仮足の成長メカニズムの分子モデルを提案したものである。3次元画像の平均化と統計処理により、分子アーキテクチャを示すことを目指すことに関連する技術も提案した。

本研究を通して、アクチン繊維が、束化タンパク質ファシンによって、規則正しく束化されていること、また、その束化の物理的限界とそれを克服するための複数の束の形成、また、アクチン繊維が束に加わっていく際のファシンの結合の協同性などを解明することに成功しており、新しいアクチン束化、糸状仮足形成の分子メカニズムを提案している。このことは、細胞運動の分子レベルの振る舞いを理解する上で、重大な知見として評価しうる。また、この結論を得るために開発した技術は、他の分野でも利用できる技術で有り、広く利用されうる。

以上により、論文調査及び最終試験の結果に基づき、審査委員会において慎重に審査した結果、本論文が、博士（情報工学）の学位に十分値するものであると判断した。